

9) JAPANESE PATENT OFFICE (J.P)  
(12) LAID-OPEN PATENT APPLICATION GAZETTE (A)  
(11) PATENT APPLICATION NUMBER 3-135923

(43) LAID OPEN: 10th June 1991

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	Identification Code	Patent Office File No.
A 61 K 39/39		8829-4C
39/12		8829-4C
39/145		8829-4C
39/205		8829-4C
39/29		8829-4C

(21) Filing No.: 1-274512

(22) Filing date: 20th October 1989

Request for Examination: None. Number of Claims 4 (Total number of pages : 4)

(54) TITLE OF THE INVENTION:

A vaccine used for viral inoculation via the nasal route, characterised by containing as adjuvant, a structural sub-unit of a Pertussigen B oligomer.

(72) Inventor: Omitaka Honda,  
14-6 Ikegame-cho,  
Kumamoto-shi, Kumamoto-ken.

(72) Inventor: Akihiro Ginei,  
1-8-18 Obiyama,  
Kumamoto-shi, Kumamoto-ken.

(72) Inventor: Kunio Osumi,  
313-20 Oazaokubo, Shimizu-cho,  
Kumamoto-shi, Kumamoto-ken.

(72) Inventor: Tetsuya Oka,  
2-44-2 Koto,  
Kumamoto-shi, Kumamoto-ken.

(72) Inventor: Mitsuo Sakawa,  
119-5 Kaminogo-cho,  
Kumamoto-shi, Kumamoto-ken.

(71) Applicant: Zaidan Hojin Kagaku Oyobi Kessei R yoho Kenkyusho,  
668 Okubo, Shimizu-cho,  
Kumamoto-shi, Kumamoto-ken.

(74) Agent: Patent Attorney Satoshi Tsutsui

FILE COPY

AJ

## 1. TITLE OF THE INVENTION.

A vaccine used for viral inoculation via the nasal route, characterised by containing as adjuvant, a structural sub-unit of a Pertussigen B oligomer.

## 2. PATENT CLAIMS

(1) A vaccine for nasal inoculation containing a structural sub-unit of a Pertussigen B oligomer or a composite of said sub-unit.

(2) A vaccine for nasal inoculation in accordance with Claim 1, in which the vaccine comprises a vaccine for the prevention of a viral infection.

(3) A vaccine for nasal inoculation in accordance with Claim 1 or Claim 2, in which the virus comprises a virus selected from influenza virus, Japanese encephalitis virus, Lyssa virus, Hepatitis A virus, Hepatitis B virus and the like.

(4) A vaccine in accordance with any one Claim of Claims 1 to 3, in which the virus comprises influenza virus.

## 3. DETAILED EXPLANATION OF THE INVENTION

This invention relates to a novel vaccine for nasal inoculation, and more particularly, this invention puts forward a vaccine for nasal inoculation which due to the addition as adjuvant of Pertussigen B oligomer sub-units or composites thereof, can produce with good efficiency, secretory antibodies and antibodies in the blood, when inoculated via the nasal membranes.

Many enzymes are used with the object of preventing infectious diseases, but with the exception of a small number of cases, such as with the oral administration of polio vaccines, administration is almost always carried out by a subcutaneous route. Present vaccines are broadly classified into live vaccines and inactivated vaccines. In the case of live vaccines, it is believed that as a result of subcutaneous administration, for example localised secretory antibody production and the like is caused in addition to the production of antibodies in the blood.

On the other hand, in the case of the subcutaneous inoculation of inactivated vaccines, antibodies are produced in the blood, but almost no other immunogenic effects can be expected to be induced.

In the case of many vaccines, for example in the defence against infection of for example hepatitis B virus and Japanese encephalitis virus, a large effect can be anticipated with the presence of antibodies in just the blood.

However, with only antibodies in the blood, a viral infection can not completely be prevented, and there is a desire for a vaccine which can induce and produce secretory type antibodies.

For example, in the case of influenza vaccine, an effect is observed caused by the subcutaneous inoculation of the present ether treated inactivated vaccine, but this is not completely satisfactory. As a method for increasing the effectiveness of the vaccine, thought has been given to the imparting of localised immunisation in the mucosal membranes of the air passages, by the inoculation of the vaccine into the nasal cavities. The reason why there are hopes for weakly toxic vaccines, is that they are strongly connected with the imparting of localised immunisation, however still more time is required for the practical utilisation of weakly toxic vaccines. There are reports of inoculation by the nasal route of ether treated vaccines resulting in localised immunisation being obtained, and at the same time, antibodies being produced within the blood, but many investigations will be necessary before there can be practical application thereof.

These inventors, as a result of assiduous investigations, discovered that the production of antibodies in the blood and also the production of secretory type antibodies which form the local immunisation, are remarkably increased by the addition to the vaccine of structural sub-units of a B oligomer of Pertussigen which is produced by a bacterial strain of Bordetella Pertussis, or a composite of the said sub-unit.

Pertussigen is an infection inhibiting antigen of Pertussian (?) vaccines, and has various biological activities such as insulin secretion increasing activity and a white blood cell increasing factor.

divided into an A protomer which participates in toxicity realisation, and, a B oligomer which participates in cell adsorption. Moreover, A protomer is composed of sub-units S1 alone, but B oligomer is constructed of 5 units of 4 kinds of sub-units, (S2), (S3), (S4), (S4) and (S5). The respective sub-units which construct the B oligomer or composites of such sub-units have no biological activity and are non-toxic proteins, and it is possible to realise various activities by first combining with A protomer. However, the result is that side effects develop at the same time as these activities develop. Accordingly, it may be understood that by using only sub-units which construct the B oligomer and have only cell affinity activity, or a composite of such sub-units, the activity of the original toxin will not be demonstrated, and there will only be realised an increase in the recognition towards the immune system of other antigens within the vaccine.

The B sub-units of the Pertussigen or a composite thereof, may be obtained for example by culturing *Bordetella pertussis* toxin I (?), purifying and preparing the Pertussigen, and thereafter, decomposing the toxin into sub-units by for example urea treatment, and thereafter by carrying out for example, purification techniques using ion chromatography. However, this invention is not limited in any way to these examples of purification and separation, or this bacterial strain of *Bordetella pertussis*.

Further, in accordance with this invention, the used added concentration of sub-units which construct the B-oligomer-of-the Pertussigen within the vaccine, is in the range of 0.01-5000  $\mu\text{g/ml}$ , more preferably 0.5-1000  $\mu\text{g/ml}$ .

The vaccine for nasal inoculation in accordance with this invention, can produce secretory type antibodies which establish local immunisation and at the same time, can induce a production of antigens within the blood greater than the production caused by subcutaneous inoculation. As a result, the said vaccine has been confirmed as being exceptionally useful even as a vaccine for infectious diseases other than bronchial infections requiring local immunisation.

In other words, the vaccine of this invention makes good the defects of the vaccines based on subcutaneous inoculation of the prior art, and is considered to be a vaccine possessing a new function. This invention will now be illustrated in

this invention is in no way limited to these Example

### REFERENCE EXAMPLE 1

Bordetella pertussis toxin I was passed through the generations (?) for 2 days at 35 deg. C. using a Bordet Genou (?) culture medium, and thereafter inoculated into a Steinar Yolte (?, phonetic translation) modified culture medium so that the bacterial concentration was 1 IOU/ml. The medium was cultured while aerating and stirring (250 rpm) for 30 minutes at 35 deg. C. The culture liquid was centrifuged and the bacterial bodies eliminated, and thereafter the supernatant was filtered off, and purified Pertussigen obtained by Apo Ceruloplasmin (ApoCP) cefalose column chromatography. To this toxin liquid was added 4M urea, and incubation carried out for 6 hours at 4 deg. C. Next, this liquid was introduced into a ApoCP cefalose column, washed with 2M urea solution, and eluted with 3M K-SCN solution, and the B oligomer sub-units or a composite thereof obtained. This sample was subject to SDS polyacrylamide gel electrophoresis assay and A protomer determination carried out using CHO cells. No sub-unit proteins of A protomer were detected, and this sample just comprised sub-unit proteins of the B oligomer.

### EXAMPLE 1

#### Preparation of the Vaccine Antigen

Eleven day embryonated hen eggs were inoculated with A/Yamagata (*phonetic translation, literal meaning "mountain shaped"*)/120/86 (H1N1) strain virus, and cultured for 48 hours at 34 deg.C. The obtained infected allantonic fluid was concentrated using an ultrafilter, and thereafter, subject to a high speed centrifuging treatment (23000 rpm, 90 minutes), and, a low speed centrifuging treatment (6000 rpm, 60 minutes). Next, sucrose density gradient centrifugation (30000 rpm, 3 hours) was carried out, and the purified virus obtained. Part of this virus liquid was taken, formalin added and the deactivated virus formed into the completely particularised antigen. Next, the the rest of the virus liquid was treated with ether, the lipid component of the virus eliminated and the ether treated antigen formed.

## Vaccine Preparation and Immunisation Tests.

The completely particularised antigen liquid prepared above was combined with the ether treated antigen liquid and the Pertussian B sub-units or a composite of said sub-units prepared in Reference Example 1, and the six types of vaccine samples shown in Table 1 prepared.

The vaccine samples were dorsally inoculated subcutaneously or inoculated via the nasal route into groups of five of BALB/c mice (6 weeks old, males). Three weeks after the inoculation of the vaccines, blood samples were taken, and the levels of antibody in the blood were measured using HI (blood cells coagulation inhibition) tests. In addition, after the blood samples had been taken, the lungs and air passages of the mice were washed with aqueous phosphate buffer, and the secretory type antibodies in the liquid washings were determined using the ELISA method.

The results are shown in Table 1.

Moreover, the HI value is shown as the reciprocal of the maximum number of times of dilution of the blood serum which completely inhibits the coagulation of four coagulated units of influenza virus (?). In addition, the secretory type antibody value comprises the number of times of dilution of the washings corresponding to a cut off value, which cut off value comprises three times the value of the photoabsorption wavelength measured for the liquid washings of mice for the non-immunised group.

### EXAMPLE 2

Vaccine samples were prepared using the same method as in Example 1, and groups of five BALB/c mice (6 weeks old, male) were inoculated dorsally or via the nasal route. Three weeks after the inoculation, the mice were exposed to A/Yamagata/120/86 (H1N1) virus, and four days later the lungs of the mice were extracted, and the quantity of virus in the lungs was determined using the Black method (*phonetic translation*) using MDCK cells.

The results are shown in Table 2.

In addition, the quantity of virus is shown as the quantity of virus which is contained in the lungs of one mouse.

TABLE 1

Vaccine sample	Inoculation method	Inoculated quantity/mouse			Antibody level	
		Quantity of liquid ( $\mu$ l)	Quantity of antigen ( $\mu$ g)	PTB ( $\mu$ g)	Antibodies in the blood	Secretory type antibodies
CPV	Subcutaneous	500	5	0	128	<1
CPV	Nasal	20	5	0	16	<1
CPV + PTB	Nasal	20	5	5	256	3
ETV	Subcutaneous	500	5	0	128	<1
ETV	Nasal	20	5	0	<16	<1
ETV + PTB	Nasal	20	5	5	256	97

Notes: CPV = completely particularised vaccine, ETV = ether treated vaccine, PTB = Pertussigen B oligomer structural units or a composite thereof.

TABLE 2

Vaccine sample	Inoculation method	Quantity inoculated/mouse			Quantity of virus in mice lung (Black's number/lung)
		Quantity of liquid ( $\mu$ l)	Quantity of antigen ( $\mu$ g)	PTB ( $\mu$ g)	
CPV	subcutaneous	500	5	0	<5
CPV	nasal	20	5	0	$1.9 \times 10^5$
CPV + PTB	nasal	20	5	5	<5
ETV	subcutaneous	500	5	0	$1.8 \times 10^5$
ETV	nasal	20	5	0	$9.0 \times 10^5$
ETV + PTB	nasal	20	5	5	<5

Notes: CPV = completely particularised vaccine, ETV = ether treated vaccine, PTB = Pertussigen B oligomer structural units or a composite thereof.

Translators notes:-

Throughout the text, the term "composite" may also be read as aggregate.

## ⑫ 公開特許公報(A)

平3-135923

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成3年(1991)6月10日

A 61 K 39/39  
39/12  
39/145  
39/205  
39/29

8829-4C  
8829-4C  
8829-4C  
8829-4C  
8829-4C

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全4頁)

⑭ 発明の名称 百日咳毒素Bオリゴマーの構成サブユニットを含有する経鼻接種ワクチン

⑮ 特 願 平1-274512

⑯ 出 願 平1(1989)10月20日

⑰ 発 明 者	本 田	臣 孝	熊本県熊本市池亀町14-6
⑱ 発 明 者	銀 永	明 弘	熊本県熊本市帯山1丁目8-18
⑲ 発 明 者	大 隈	邦 夫	熊本県熊本市清水町大字大隈313-20
⑳ 発 明 者	岡	徹 也	熊本県熊本市湖東2-44-2
㉑ 発 明 者	酒 匂	光 郎	熊本県熊本市上ノ郷町119-5
㉒ 出 願 人	財団法人化学及血清療法研究所		熊本県熊本市清水町大隈668番地
㉓ 代 理 人	弁理士 筒 井 知		

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

百日咳毒素Bオリゴマーの構成サブユニットを含有する経鼻接種ワクチン

## 2. 特許請求の範囲

(1) 百日咳毒素のBオリゴマーを構成するサブユニットまたはその会合体をアジュバントとして含有することを特徴とする経鼻接種用ワクチン

(2) ワクチンがウイルス性疾患の予防用ワクチンである、特許請求の範囲第1項記載の経鼻接種用ワクチン

(3) ウイルスが、インフルエンザウイルス、日本脳炎ウイルス、狂犬病ウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス等から選ばれたものである特許請求の範囲第1項または第2項記載の経鼻接種用ワクチン

(4) ウイルスが、インフルエンザウイルスである特許請求の範囲第1項から第3項の何れか1項記載の経鼻接種用ワクチン

## 3. 発明の詳細な説明

本発明は新規な経鼻接種用ワクチン、さらに詳しくは、感染症の予防に有効な成分を含むワクチンに、百日咳毒素のBオリゴマーを構成するサブユニットまたはその会合体をアジュバントとして添加することにより、鼻粘膜接種した時の血中抗体および分泌型抗体を効率良く産生させ得る経鼻接種用ワクチンを提供することに関する。

感染症の予防の目的で数多くのワクチンが用いられているが、経口投与法のポリオワクチン等少数の例を除けば、ほとんどの場合皮下接種法によって実施されている。現在のワクチンは生ワクチンと不活化ワクチンに大別でき、生ワクチンの場合皮下接種によって血中抗体産生の他、局所の分泌抗体産生等も誘導されると考えられている。

一方、不活化ワクチンの皮下接種の場合には、血中抗体は産生されるが他の免疫効果の誘導はほとんど期待出来ない。

多くのワクチンの場合、例えばB型肝炎ウイルスや日本脳炎ウイルス等の感染に対する防御には、



血中抗体が存在だけで大きな効果が期待出来る。

しかしながら、血中抗体だけではウイルスの感染を完全には防御出来ず、分泌型抗体の産生誘導が望まれるようなワクチンがある。

例えば、インフルエンザワクチンの場合、現行のエーテル処理不活化ワクチンの皮下接種によっても有効であることが認められているが、十分に満足されるものではない。ワクチンの有効性を高める方法として、ワクチンを鼻腔内に接種して上気道粘膜における局所免疫を付与することが考えられている。弱毒生ワクチンが期待される理由には、この局所免疫の付与が大きく関係しているが、弱毒生ワクチンの実用化にはまだまだ日時を要する。現行エーテル処理ワクチンの経鼻接種によっても局所の免疫が得られ、同時に血中抗体が産生されることが報告されているが、実用化までには多くの検討を要する。

本発明者等は鋭意研究を重ねた結果、百日咳菌の産生する百日咳毒素のBオリゴマーの構成サブユニットまたはその会合体をワクチンに加えるこ

とにより、ワクチンの経鼻接種における血中抗体の産生および局所の免疫を成立させる分泌型抗体の産生を著しく高めることを発見した。

百日咳毒素は百日咳ワクチンの感染防御抗原の1つであり、インシュリン分泌増強活性や白血球増加因子等の種々の生物学的活性を有している。

百日咳毒素の分子量は約117,000で、その構造は活性発現に関与するAプロトマーと細胞への吸着に関与するBオリゴマーに分けられる。さらに、Aプロトマーはサブユニット(S1)単独からなるが、Bオリゴマーは(S2),(S3),(S4),(S4),および(S5)の4種5個のサブユニットから構成されている。Bオリゴマーを構成するそれぞれのサブユニットまたはその会合体には生物学的活性は無く無毒な蛋白であり、Aプロトマーと会合して初めて種々の活性を発現することが出来る。しかしながら、これらの活性の発現は同時に、副作用の発現にも結びつくことになる。そこで、細胞との親和活性だけを有するBオリゴマーを構成するサブユニットまたはその会合体のみを用いること

は、毒素本来の活性は示さず、ワクチン中の他の抗原の免疫系への認識を高めることだけに役立つと考えられる。

百日咳毒素のBサブユニットまたはその会合体は、例えば、百日咳菌東浜1相菌を培養、精製して百日咳毒素を得、さらに尿素処理等で毒素をサブユニットに解離後、イオンクロマトグラフィー法により精製する手段等によって得られるが、本発明は百日咳菌株または精製分離の手段がこれらの例に限られるものではない。

また本発明におけるワクチン中の百日咳毒素のBオリゴマーを構成するサブユニットまたはその会合体の添加濃度は0.01～5000  $\mu\text{g/ml}$ 、好ましくは0.5～1000  $\mu\text{g/ml}$ の範囲で使用される。

本発明による経鼻接種ワクチンは、局所免疫を成立させる分泌型抗体の産生と同時に皮下接種によって産生される以上の血中抗体の産生も誘導することが出来ることから、局所免疫が要求される気道感染症以外の感染症のワクチンとしても非常に有用であることが確認された。

即ち、本発明のワクチンは従来の皮下接種法によるワクチンの欠点を補った、新しい機能を備えたワクチンであると考えられる。以下に実施例をあげて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 参考例1

百日咳菌東浜1相菌をボルデージャング培地を用い、35℃で2日間継代後、ステナージョルテ変法培地に、菌濃度が110U/mlとなるように接種し、35℃で30時間通気攪拌培養(250rpm)を行った。培養液を遠心して菌体を除去した後、その上清を口過し、アボセルロプラスミン(ApocP)セファロースカラムクロマトグラフィーにかけて精製百日咳毒素を得た。この毒素液に4Mの尿素を加え、4℃で6時間インキュベーションした。次にこの液をApocPセファロースカラムに通し、2M尿素溶液で洗浄した後、3MK-SCN溶液で溶出してBオリゴマーのサブユニットまたはその会合体を得た。この試料について、

S D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動検定および C H O 細胞を用いた A プロトマー定量を実施したところ本試料は B オリゴマーのサブユニット蛋白のみで、A プロトマーのサブユニット蛋白は検出されなかった。

#### 実施例 1

##### ワクチン抗原の調製

A / 山形 / 120 / 86 (H1N1) 株ウイルスを 11 日孵化鶏卵に接種し、34℃で 48 時間培養した。得られた感染尿膜腔液を限外ろ過器によって濃縮した後、高速遠心 (23000rpm, 90 分) 処理、低速遠心 (6000rpm, 60 分) 処理を行い、次にショ糖密度勾配遠心 (30000rpm, 3 時間) 処理を実施して精製ウイルスを得た。このウイルス液の一部を採り、ホルマリンを添加してウイルスを不活化したものを全粒子抗原とした。また、残りのウイルス液はエーテルで処理し、ウイルスの脂質分を除去したものをエーテル処理抗原とした。

##### ワクチンの調製および免疫試験

実施例 1 と同様な方法でワクチンサンプルを調製し、各群 5 匹の B A L B / c マウス (6 週齢、雌) に背部接種または経鼻接種した。ワクチンの接種から 3 週後にマウスで馴化した A / 山形 / 120 / 86 (H1N1) ウイルスを暴露し、その 4 日後にマウスの肺を取り出し、肺内のウイルス量を M D C K 細胞を用いたブラック法で測定した。

その成績を第 2 表に示した。

尚、ウイルス量は、1 匹のマウスの肺に含まれるウイルス量として表した。

上記で調製した全粒子抗原液またはエーテル処理抗原液と参考例 1 で得られた百日咳 B サブユニットまたはその会合体を組み合わせて、第 1 表に示した 6 種のワクチンサンプルを調製した。

ワクチンサンプルを各群 5 匹の B A L B / c マウス (6 週齢、雌) に背部皮下接種または経鼻接種した。ワクチンの接種から 3 週後にマウスから採血し、血中抗体価を H I (血球凝集抑制) 試験によって測定した。また、採血後のマウスの気管と肺をリン酸緩衝食塩水で洗浄し、その洗浄液中の分泌型抗体を E L I S A 法によって測定した。

その成績を第 1 表に示した。

尚、H I 価は、インフルエンザウイルスの 4 凝集単位の凝集を完全に抑制する血清の最高希釈倍数の逆数で表した。また分泌型抗体価は、非免疫群のマウスの洗浄液について測定した吸光度の 3 倍の値を cut off 値とし、この値に相当する洗浄液の希釈倍数を抗体価とした。

#### 実施例 2

第 1 表

ワクチン	接種法	接種量/マウス			抗体価	
		液量 ( $\mu$ l)	抗原量 ( $\mu$ g)	PTB 量 ( $\mu$ g)	血中抗体	分泌型抗体
全粒子ワクチン	皮下	500	5	0	128	<1
全粒子ワクチン	経鼻	20	5	0	16	<1
全粒子ワクチン + PTB	経鼻	20	5	5	256	3
E-78 処理ワクチン	皮下	500	5	0	128	<1
E-78 処理ワクチン	経鼻	20	5	0	<16	<1
E-78 処理ワクチン + PTB	経鼻	20	5	5	256	97

PTB: 百日咳毒素 BIV37- の構成 1212-1 またはその会合体

第2表

ワクチン名	接種法	接種量/マウス			マウス 肺内ウイルス量 (フロック数/マウス)
		液 量 ( $\mu$ l)	抗原量 ( $\mu$ g)	PTB 量 ( $\mu$ g)	
全粒子ワクチン	皮下	500	5	0	< 5
全粒子ワクチン	経鼻	20	5	0	$1.9 \times 10^5$
全粒子ワクチン + PTB	経鼻	20	5	5	< 5
I-7A処理ワクチン	皮下	500	5	0	$1.8 \times 10^5$
I-7A処理ワクチン	経鼻	20	5	0	$9.0 \times 10^5$
I-7A処理ワクチン + PTB	経鼻	20	5	5	< 5

PTB : 百日咳毒素 B<sub>100</sub> の構成 ユニット またはその会合体

特許出願人 財団法人 化学及血清療法研究所

代理人 弁理士 筒井 知



## ⑫ 公開特許公報(A)

平3-135923

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 平成3年(1991)6月10日

A 61 K 39/39  
39/12  
39/145  
39/205  
39/29

8829-4C  
8829-4C  
8829-4C  
8829-4C  
8829-4C

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全4頁)

⑥ 発明の名称 百日咳毒素Bオリゴマーの構成サブユニットを含有する経鼻接種ワクチン

⑪ 特 願 平1-274512

⑫ 出 願 平1(1989)10月20日

⑬ 発 明 者	本 田	臣 孝	熊本県熊本市池亀町14-6
⑬ 発 明 者	銀 永	明 弘	熊本県熊本市帯山1丁目8-18
⑬ 発 明 者	大 隈	邦 夫	熊本県熊本市清水町大字大窪313-20
⑬ 発 明 者	岡	徹 也	熊本県熊本市湖東2-44-2
⑬ 発 明 者	酒 匂	光 郎	熊本県熊本市上ノ郷町119-5
⑭ 出 願 人	財団法人化学及血清療法研究所		熊本県熊本市清水町大窪668番地
⑮ 代 理 人	弁理士 筒 井 知		

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

百日咳毒素Bオリゴマーの構成サブユニットを含有する経鼻接種ワクチン

## 2. 特許請求の範囲

- (1) 百日咳毒素のBオリゴマーを構成するサブユニットまたはその会合体をアジュバントとして含有することを特徴とする経鼻接種用ワクチン
- (2) ワクチンがウイルス性疾患の予防用ワクチンである、特許請求の範囲第1項記載の経鼻接種用ワクチン
- (3) ウイルスが、インフルエンザウイルス、日本脳炎ウイルス、狂犬病ウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス等から選ばれたものである特許請求の範囲第1項または第2項記載の経鼻接種用ワクチン
- (4) ウイルスが、インフルエンザウイルスである特許請求の範囲第1項から第3項の何れか1項記載の経鼻接種用ワクチン

## 3. 発明の詳細な説明

本発明は新規な経鼻接種用ワクチン、さらに詳しくは、感染症の予防に有効な成分を含むワクチンに、百日咳毒素のBオリゴマーを構成するサブユニットまたはその会合体をアジュバントとして添加することにより、鼻粘膜接種した時の血中抗体および分泌型抗体を効率良く産生させ得る経鼻接種用ワクチンを提供することに関する。

感染症の予防の目的で数多くのワクチンが用いられているが、経口投与法のポリオワクチン等少数の例を除けば、ほとんどの場合皮下接種法によって実施されている。現在のワクチンは生ワクチンと不活化ワクチンに大別でき、生ワクチンの場合皮下接種によって血中抗体産生の他、局所の分泌抗体産生等も誘導されると考えられている。

一方、不活化ワクチンの皮下接種の場合には、血中抗体は産生されるが他の免疫効果の誘導はほとんど期待出来ない。

多くのワクチンの場合、例えばB型肝炎ウイルスや日本脳炎ウイルス等の感染に対する防御には、

血中抗体が存在だけで大きな効果が期待出来る。

しかしながら、血中抗体だけではウイルスの感染を完全には防御出来ず、分泌型抗体の産生誘導が望まれるようなワクチンがある。

例えば、インフルエンザワクチンの場合、現行のエーテル処理不活化ワクチンの皮下接種によっても有効であることが認められているが、十分に満足されるものではない。ワクチンの有効性を高める方法として、ワクチンを鼻腔内に接種して上気道粘膜における局所免疫を付与することが考えられている。弱毒生ワクチンが期待される理由には、この局所免疫の付与が大きく関係しているが、弱毒生ワクチンの実用化にはまだまだ日時を要する。現行エーテル処理ワクチンの経鼻接種によっても局所の免疫が得られ、同時に血中抗体が産生されることが報告されているが、実用化までには多くの検討を要する。

本発明者等は鋭意研究を重ねた結果、百日咳菌の産生する百日咳毒素のBオリゴマーの構成サブユニットまたはその会合体をワクチンに加えるこ

とにより、ワクチンの経鼻接種における血中抗体の産生および局所の免疫を成立させる分泌型抗体の産生を著しく高めることを発見した。

百日咳毒素は百日咳ワクチンの感染防御抗原の1つであり、インシュリン分泌増強活性や白血球増加因子等の種々の生物学的活性を有している。

百日咳毒素の分子量は約117,000で、その構造は活性発現に関与するAプロトマーと細胞への吸着に関与するBオリゴマーに分けられる。さらに、Aプロトマーはサブユニット(S1)単独からなるが、Bオリゴマーは(S2),(S3),(S4),(S4),および(S5)の4種5個のサブユニットから構成されている。Bオリゴマーを構成するそれぞれのサブユニットまたはその会合体には生物学的活性は無く無毒な蛋白であり、Aプロトマーと会合して初めて種々の活性を発現することが出来る。しかしながら、これらの活性の発現は同時に、副作用の発現にも結びつくことになる。そこで、細胞との親和活性だけを有するBオリゴマーを構成するサブユニットまたはその会合体のみを用いること

は、毒素本来の活性は示さず、ワクチン中の他の抗原の免疫系への認識を高めることだけに役立つと考えられる。

百日咳毒素のBサブユニットまたはその会合体は、例えば、百日咳菌菌液1相菌を培養、精製して百日咳毒素を得、さらに尿液処理等で毒素をサブユニットに解離後、イオンクロマトグラフィー法により精製する手段等によって得られるが、本発明は百日咳菌株または精製分離の手段がこれらの例に限られるものではない。

また本発明におけるワクチン中の百日咳毒素のBオリゴマーを構成するサブユニットまたはその会合体の添加濃度は0.01～5000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは0.5～1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲で使用される。

本発明による経鼻接種ワクチンは、局所免疫を成立させる分泌型抗体の産生と同時に皮下接種によって産生される以上の血中抗体の産生も誘導することが出来ることから、局所免疫が要求される気道感染症以外の感染症のワクチンとしても非常に有用であることが確認された。

即ち、本発明のワクチンは従来の皮下接種法によるワクチンの欠点を補った、新しい機能を備えたワクチンであると考えられる。以下に実施例をあげて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 参考例1

百日咳菌菌液1相菌をボルデー・ジャング培地を用い、35℃で2日同様に培養後、ステナースホルテ産法培地に、菌密度が110U/mlとなるように接種し、35℃で30時間過気攪拌培養(250rpm)を行った。培養液を遠心して菌体を除去した後、その上清を口過し、アボセルロプラスミン(ApocP)セファロースカラムクロマトグラフィーにかけて精製百日咳毒素を得た。この毒素液に4Mの尿液を加え、4℃で6時間インキュベーションした。次にこの液をApocPセファロースカラムに過し、2M尿液で洗浄した後、3MK-SCN溶液で溶出してBオリゴマーのサブユニットまたはその会合体を得た。この試料について、

S D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動検定およびC H O 細胞を用いたAプロトマー定量を実施したところ本試料はBオリゴマーのサブユニット蛋白のみで、Aプロトマーのサブユニット蛋白は検出されなかった。

#### 実施例1

##### ワクチン抗原の調製

A/山形/120/86(H1N1)株ウイルスを11日孵化鶏卵に接種し、34℃で4.8時間培養した。得られた感染尿膜腔液を限外ろ過器によって濃縮した後、高速遠心(23000rpm,90分)処理、低速遠心(6000rpm,60分)処理を行い、次にショ糖密度勾配遠心(30000rpm,3時間)処理を実施して精製ウイルスを得た。このウイルス液の一部を採り、ホルマリンを添加してウイルスを不活化したものを全粒子抗原とした。また、残りのウイルス液はエーテルで処理し、ウイルスの脂質分を除去したものをエーテル処理抗原とした。

##### ワクチンの調製および免疫試験

実施例1と同様な方法でワクチンサンプルを調製し、各群5匹のBALB/cマウス(6週齢、雌)に背部接種または経鼻接種した。ワクチンの接種から3週後にマウスで馴化したA/山形/120/86(H1N1)ウイルスを暴露し、その4日後にマウスの肺を取り出し、肺内のウイルス量をMDCK細胞を用いたブラック法で測定した。その成績を第2表に示した。

尚、ウイルス量は、1匹のマウスの肺に含まれるウイルス量として表した。

上記で調製した全粒子抗原液またはエーテル処理抗原液と参考例1で得られた百日咳Bサブユニットまたはその会合体を組み合わせて、第1表に示した6種のワクチンサンプルを調製した。

ワクチンサンプルを各群5匹のBALB/cマウス(6週齢、雌)に背部皮下接種または経鼻接種した。ワクチンの接種から3週後にマウスから採血し、血中抗体価をHI(血球凝集抑制)試験によって測定した。また、採血後のマウスの気管と肺をリン酸緩衝食塩水で洗浄し、その洗浄液中の分泌型抗体をELISA法によって測定した。

その成績を第1表に示した。

尚、HI価は、インフルエンザウイルスの4凝集単位の凝集を完全に抑制する血清の最高希釈倍数の逆数で表した。また分泌型抗体価は、非免疫群のマウスの洗浄液について測定した吸光度の3倍の値をcut off値とし、この値に相当する洗浄液の希釈倍数を抗体価とした。

#### 実施例2

第1表

ワクチン	接種法	接種量/マウス			抗体価	
		液量 ( $\mu$ l)	抗原量 ( $\mu$ g)	PTB量 ( $\mu$ g)	血中抗体	分泌型抗体
全粒子ワクチン	皮下	500	5	0	128	<1
全粒子ワクチン	経鼻	20	5	0	16	<1
全粒子ワクチン + PTB	経鼻	20	5	5	256	3
E-処理ワクチン	皮下	500	5	0	128	<1
E-処理ワクチン	経鼻	20	5	0	<16	<1
E-処理ワクチン + PTB	経鼻	20	5	5	256	97

PTB: 百日咳毒素 B1937- の構成 122ユニット またはその会合体

第2表

ワクチン名	接種法	接種量/マウス			マウス 肺内ウイルス量 (プラック数/マウス)
		液量 ( $\mu$ l)	抗原量 ( $\mu$ g)	PTB 量 ( $\mu$ g)	
全粒子ワクチン	皮下	500	5	0	< 5
全粒子ワクチン	経鼻	20	5	0	$1.9 \times 10^5$
全粒子ワクチン + PTB	経鼻	20	5	5	< 5
I-FA処理ワクチン	皮下	500	5	0	$1.8 \times 10^5$
I-FA処理ワクチン	経鼻	20	5	0	$9.0 \times 10^5$
I-FA処理ワクチン + PTB	経鼻	20	5	5	< 5

PTB : 百日咳毒素 B<sub>19127</sub> の構成 (F<sub>1</sub>に<sub>1</sub>) またはその会合体

特許出願人 財団法人 化学及血清療法研究所

代理人 弁理士 筒井 知

